Aus dem Städtischen Krankenhaus, Nürnberg.

Studien über die Einwirkung von Pneumokokken auf den extravasalen Blutfarbstoff.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexanders-Universität
Erlangen

vorgelegt von

Resi Bergmann

aus Gollhofen bei Uffenheim.

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 1938.

1938

Buchdruckerei Karl Döres, Erlangen, Jägerstraße 3.

Referent: Prof. Dr. K. v. Angerer.

Dekan: Prof. Dr. R. Greving.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Studien über die Einwirkung von Pneumokokken auf den extravasalen Blutfarbstoff.

Die Stoffwechselprodukte, die die Bakterien im allgemeinen bilden, fordern nicht nur hinsichtlich der giftigen Auswirkung auf den menschlichen Körper, sondern auch hinsichtlich ihrer rein chemischen Umsetzungen unser größtes Interesse heraus. Besonders sinnfällig sind die Veränderungen, die auf den Blutagarplatten manche Keime, z. B. die Streptokokken, Pneumokokken usw., aber auch bestimmte Anaerobier, z. B. Gasbazillen hervorrufen. Ueber die Mechanik der Farbstoffumbildung, vor allem über die chemischen Endprodukte war bis jetzt noch wenig bekannt.

In Anlehnung an frühere Untersuchungen von Bingold wurde mir die Aufgabe gestellt, die Einwirkung von Pneumokokken auf Haemoglobin an Hand von Kulturversuchen auf Blutagar zu studieren. Zurückgreifend auf bereits bekannte Tatsachen beim bakteriellen Blutfarbstoffabbau gestaltete sich die Versuchsanordnung folgendermaßen:

1. Pneumokokken werden auf einer gewöhnlichen Blutplatte, die Menschenblut und Agar etwa im Verhältnis 1 : 7 enthält, ausgestrichen. Nach 24 stündiger Bebrütung zeigt die Platte das bekannte, zarte Wachstum der Kolonien, die kaum die Oberfläche des Nährbodens überragen. Irgendwelche Veränderungen der Platte können nicht beobachtet werden, das Haemoglobin ist völlig unverändert geblieben; eine Umwandlung von Oxyhaemoglobin in Haematin oder andere Blutfarbstoffabkömmlinge ist nicht eingetreten. Der Haematingehalt ist zum mindesten nicht größer als der einer bakterienfreien Kontrollösung. Auch die spektroskopische Untersuchung ergibt stets nur die Streifen des Oxyhaemoglobins (zwei dunkle Streifen im Spektrum bei 578 und 542 $\mu\mu$).

Pneumokokken greifen also praktisch aerob auf gewöhnlichem Blutagar das Oxyhaemoglobin nicht an.

2. Defibriniertes, auf etwa 68—70° erhitztes Menschenblut wird mit Agar zusammengebracht und dieser Nährboden mit Pneumokokken beschickt und in den Brutschrank gestellt. Nach 24 Stunden ergibt sich ein wesentlich anderes Bild: auf der sonst unveränderten Platte zeigen die Pneumokokken ein üppiges Wachstum, die Ränder ragen wallartig über die Umgebung hervor. Die Impfstrichlinie hebt sich als dunkler Streifen von der übrigen Umgebung ab, sodaß man glauben könnte, defibriniertes Blut sei auf die Platte dick aufgeträufelt oder mit dem Pinsel aufgetragen worden. Noch deutlicher wird diese Erscheinung, wenn die Platten ein bis zwei Tage stehen. Die Kulturen lassen sich dann leicht in Form eines Bakterienbändchens von der Unterlage abheben.

Auch hier interessiert natürlich die spektroskopische Untersuchung des gebildeten Bakterienbandes. Zu diesem Zweck werden 1 bis 2 Tropfen Schwefelammonium zugesetzt. Im Spektrum erscheint dann ein dunkler Streifen bei 559 $\mu\mu$. Er entspricht dem zu Hämochromogen reduzierten Hämatin.

Dieses ist von den Pneumokokken aus dem Oxyhämoglobin des Nährbodens gebildet worden — (durch Erhitzen allein tritt bekanntlich Hämatin erst bei 80° auf!) — jedoch nur im Bereich des abhebbaren Bakterienbändchens; der umgebende Nährboden enthält nach wie vor Oxyhämoglobin.

Bingold erklärt die Erscheinung der „Blutanhäufung" im Kolonienbereich dadurch, daß die Bakterienzellen den Blutfarbstoff an sich ziehen und es so zu einer zentripetalen Anhäufung kommt, die im Gegensatz zur zentrifugalen Hämolyse Kämmerers steht, für welche ja die Verschiebung des Blutfarbstoffs in die weitere Umgebung charakteristisch ist.

Wir sehen also, daß bei einer Erhitzung des Blutes auf 68—70° die Pneumokokken befähigt sind, Oxyhämoglobin zu Hämatin abzubauen.

3. Kochblut- (Hämatin-) platten werden mit Pneumokokken beimpft und der Erwärmung im Brutschrank ausgesetzt. Schon nach einiger Zeit ist rund um die Kolonien herum eine beginnende Aufhellung zu beobachten, die vom Zentrum aus immer weiter um sich greift, bis allmählich die Entfärbung in breiter Form die ganze Platte eingenommen hat. Die Blutplatten, ehemals braun, sind vollkommen entfärbt, d. h. sie nehmen einen hellgelblichen, stumpfen Farbton an.

Die Berlinerblaureaktion ist im Bereich des Farbenumschlags positiv, ein Zeichen, daß freies Eisen vorhanden ist. Es ist also der Abbau sehr weit vor sich gegangen, denn chemisch findet ja bekanntlich die Abtrennung

von Eisen aus dem Blutfarbstoff erst dann statt, wenn starke Salzsäure bei 165° auf Blut einwirkt! —

Manchmal treten auf der Platte sogar drei Zonen in Erscheinung: im Zentrum Eisenabspaltung, daran anschließend ein schmaler Hämatinstreifen, der nach der Peripherie zu in unverändertes Hämoglobin übergeht.

4. Im Gegensatz zu Versuch 3 kann beim Wachstum von Staphylokokken, Angehörigen der Typhus-Coli-Reihe und anderen Keimen auf der Kochbluthämatinplatte keine ähnliche tiefgreifende Wirkung nachgewiesen werden. Auf Blutagar wachsen die Kolonien höchstens hämolytisch.

5. Pneumokokken werden auf einer normalen, nicht vorbehandelten, also unerhitzten Gänseblutplatte ausgestrichen. Nach der üblichen Bebrütung erkennt man auch hier einen intensiven Farbenumschlag der ganzen Platte, die völlig aufgehellt ist. Als Zeichen eines weitgehenden Blutabbaus verläuft auch hier, wie bei Versuch 3, die Berlinerblaureaktion positiv; also müssen ähnliche Vorgänge wie auf der Kochbluthämatinplatte, — die über 73° erhitztes Menschenblut enthält, — sich abspielen.

6. Versuche mit unerhitztem Enten- und Taubenblut ergeben die gleichen Resultate wie Versuch 5. Auch hier erkennt man die hellgelbe Aufhellung und Verfärbung der Platte und die positive Eisenreaktion.

Wie sind diese Vorgänge, die sich unter der Einwirkung lebender Bakterien auf den Blutfarbstoff abspielen, aufzufassen?

Die Tatsache, daß sich auf erhitztem Blut ein Farbenumschlag des Nährbodens bemerkbar macht, war auch anderen Autoren nicht entgangen.

Verschiedene Autoren (Sternberg, Voges, Bieling, Seitz) versuchten zur weiteren Differenzierung von Keimen eine Modifizierung des von Schottmüller angegebenen Blutagars (= 2 Teile Blut, 1 Teil Agar) durchzuführen. Ihre Versuche, Blut zu kochen, scheiterten bzw. wurden erheblich gestört durch die in Klumpen ausfallenden Eiweißkoagula.

Bei seinen Arbeiten mit gekochtem Blutagar hat Sternberg 1894 wohl zuerst die Feststellung gemacht, daß bestimmte Bakterien z. B. die Pneumokokken unter Aufhellung ihrer Umgebung wuchsen.

Voges fand bei seinen Studien diese Angaben bestätigt. Er benützte als Nährboden kochenden Agar, dem einige Tropfen frischen, defibrinierten Pferdeblutes zugesetzt wurden.

Später hat sich auch Bieling mit dem sogenannten Kochblutagar befaßt. Er modifizierte wiederum die Voges'sche Angabe und stellte seinen Nährboden folgendermaßen her: „3% Agar mit

1% Pepton werden zum Kochen erhitzt und sofort von der Flamme abgesetzt nach Vermischung mit 15% defibrinierten Pferdeblutes. Nach Abkühlen auf etwa 50—60° wird der schokoladenbraune Niederschlag gut aufgeschüttelt und die fein verteilte Mischung zu Platten und Röhrchen gegossen."

Auf diesem Kochblutagar wuchsen, wie Bieling bemerkte, die Pneumokokken als grünlich-gelbe Kolonien, umgeben von einer breiten, ebenso verfärbten Zone auf der braunen Fläche. Das gleiche Wachstum erkannte er bei Streptokokkus viridans, während er dem Streptokokkus longus (hämol.) ein Wachstum in grauen Kolonien zuschrieb, das eine Veränderung des Blutfarbstoffes vermissen ließ.

Wie schon eingangs erwähnt, hatte auch der von Bieling hergestellte Nährboden den Nachteil, daß eine konstante Zusammensetzung des Nährbodens durch die Koagulation des Blutes verhindert wurde.

Seitz hat in seinen Nachprüfungen diesen Nachteil klar erkannt und deshalb ausdrücklich vor dem sogenannten Hämatinagar gewarnt, da beim Erhitzen über 80° oder gar beim Kochen des Blutes eine Hämatinbildung zustande komme, Methämoglobin aber kaum mehr zur Verfügung stehe und infolgedessen die Stufe des Abbaues vom Methämoglobin bis zum Hämatin von den Streptokokken nicht mehr geleistet werde. „Hinzu kommt, daß bei einem Kochen des Blutes sich äußerst derbe Gerinnsel bilden, die sich schon während des Gießens und dem folgenden Abkühlen der Gußplatte zu Boden senken, den Blutfarbstoff mit sich reißend, sodaß in den oberen Schichten einer solchen Platte gar kein oder zu geringer abbaufähiger Blutfarbstoff vorhanden ist."

Seitz arbeitete mit der Methämoglobinagarplatte, zu deren Gewinnung er folgende Angaben machte: Frisches, durch Herzpunktion gewonnenes Kaninchen- oder Hammelblut wird bis zum Braunwerden vorsichtig erhitzt und so eine Methämoglobinlösung hergestellt. Es ist dabei besonders darauf zu achten, das Blut nicht zu stark zu erhitzen, da das Oxyhämoglobin, wenn es eine Zeit lang über 80° erhitzt wird, durch Wasseraufnahme in Hämatin und Globin gespalten wird. Diese Methämoglobinlösung vermischte Seitz in verschiedener Konzentration mit dem auf 72—74° abgekühlten Agar kurz vor dem Gießen der Platten. Erst verwandte er Agar von 7,5%igem Kaninchen- oder Hammelblut, später verminderte er die Konzentration erheblich.

Bei seinen zahlreichen Versuchen, die Seitz auf seiner Methämoglobinplatte anstellte, kam er zu dem Schluß: auch bei einer Verminderung der Konzentration des Methämoglobinzusatzes zeigt sich beim Wachstum von Kolonien deutlich eine Veränderung des

Nährbodens. Er beobachtete schon nach 12 Stunden eine grüngelbe Verfärbung, die besonders deutlich beim Wachstum von Viridans und Pneumokokkenstämmen auftrat und sich in der charakteristischen breiten Zone der Entfärbung und der „milchkaffee"-farbenen Aufhellung, mit dem grünlichen Farbton der Ränder, äußerte. Diese milchkaffeefarbene Aufhellung fand er auch beim Streptokokkus pyogenes hämolyticus, der jedoch den grünlichen Ton der Ränder oft vermissen ließ.

Er erachtete die Methämoglobinplatte als bedeutend empfindlicher als Reagens auf hämolytische sowie Viridans-Streptokokken und Pneumokokken als die Schottmüller'sche Oxyhämoglobinplatte.

Mit Hilfe seiner Methämoglobinplatte gelang es Seitz außerdem, zwei Stämme von Milchsäurestreptokokken zu unterscheiden: einen H-Typ, der nach 12 Stunden beginnende, nach 24 Stunden eine starke hellgelb-braune Verfärbung des Nährbodens hervorrief, und einen Z-Typ, der diese Eigenschaften vermissen ließ und die Methämoglobinplatte unverändert ließ.

Uebereinstimmend zeitigten die Untersuchungen aller Autoren das Ergebnis, daß Pneumokokken und Viridansstreptokokken auf den erhitzten oder gekochten Blutnährböden eine wesentliche Veränderung des Blutfarbstoffes hervorriefen. Von Seitz wird dabei ein Abbau über das Hämatin aber ausdrücklich verneint.

Die Nachteile, die der Kochblutagar hinsichtlich einwandfreier Herstellung besitzt, hat Bingold folgendermaßen beseitigt: Um beim Kochen des Blutes die grobe Koagulation zu verhindern und eine gleichmäßig zusammengesetzte Kochblutplatte herzustellen, die einerseits das Blut in genau zu bestimmender Menge enthält, andrerseits eine konstante Zusammensetzung des Nährbodens garantiert, hat es sich nach Bingold als nutzbringend erwiesen, einen Teil Blut mit 2—3 Teilen einer 1 $^0/_{00}$ Natriumsilikatlösung zu mischen. Es ist besonders darauf zu achten, daß das Blut frisch und durch Schütteln gut defibriniert ist. Man erhitzt die Blutlösung im Wasserbad unter ständigem leichten Schütteln langsam bis zur Siedetemperatur. Um eine gleichmäßige Erhitzung durchzuführen, muß das Gefäß im Wasserbad aufgehängt sein, es soll möglichst nicht mit der Wand des Kochgefäßes in Berührung kommen. Die einmal aufgekochte Blutmischung kann jederzeit immer wieder auf Siedetemperatur erhitzt werden und läßt sich so leicht steril erhalten.

Die Lösung besteht aus einer schwach alkalischen Hämatineiweißmischung. Mit Agar zusammengebracht ergibt sie einen Nährboden, auf dem auch sonst schwer züchtbare aerobe Keime ein üppiges Wachstum zeigen. Er enthält in allen Schichten eine bis

zum Hämatin abgebaute Blutfarbstofflösung in feinster Verteilung. Auch spektroskopische Untersuchungen beweisen das Vorhandensein einer Hämatineiweißlösung in feiner Emulsion.

Schon bei Vorversuchen auf dem von ihm hergestellten Nährboden fand Bingold, daß bestimmte Streptokokken und Pneumokokken ein charakteristisches Wachstum erkennen ließen. Verschiedene Stämme dieser Keime zeigten nämlich eine auffällige Veränderung der Platte, die sich in dem früher schon beobachteten besonderen Farbenumschlag kundtat. Die Umgebung der Kolonien wies eine hellbräunlich-gelbe, der Farbe eines Milchkaffees ähnliche Aufhellung auf. Oft ergriff dieser Farbenumschlag die ganze Platte, so bei Pneumokokken, die eine intensive Entfärbung hervorriefen, während der grünliche Farbenton der Ränder, der besonders bei Streptokokkus viridans auffallend in Erscheinung trat, nicht so deutlich wurde.

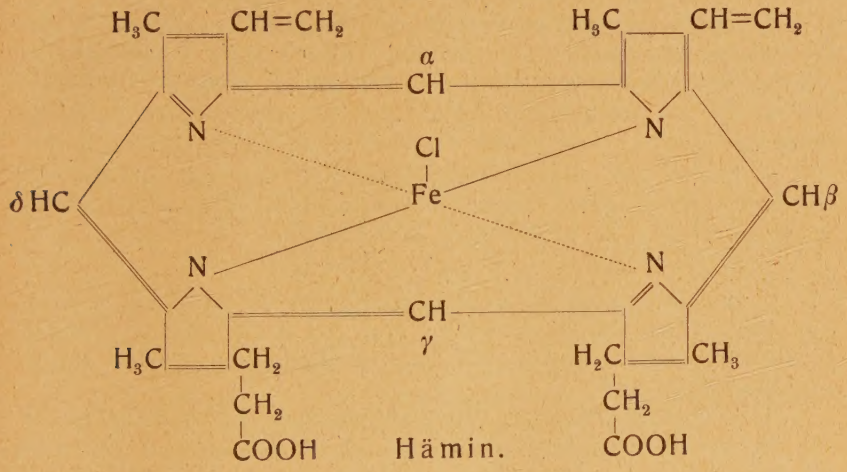
Im Gegensatz zu Seitz, der bekanntlich einen Abbau über das Hämatin hinaus strikte ablehnte, fand Bingold nun in seinen zahlreichen Untersuchungen immer wieder bestätigt, daß sich das Hämatin in viel charakteristischer Weise in die weiteren Bausteine des Blutfarbstoffs zerlegen läßt. Er konnte schon 1927 nachweisen, daß bestimmte Bakterien von Blutfarbstoffabkömmlingen — sei es nun Methämoglobin oder Hämatin — Eisen abspalten, da im Bereich der entfärbten Zone eine positive Berlinerblaureaktion beobachtet werden konnte. Vom Farbstoff muß also unter Einwirkung der Erreger das Eisen in ionisierter Form abgetrennt worden sein und damit ist von ihm der Beweis erbracht worden, daß doch eine weitere Zerlegung des Hämatins stattgefunden haben muß.

Einen Zusammenhang mit irgendwelchen hämolytischen Vorgängen weist Bingold zurück, da in den aufgehellten hämolytischen Zonen um die Streptokokkenkolonien im Gegensatz zu den Entfärbungszonen der Pneumokokken die positive Eisenreaktion nie nachzuweisen war. Er schließt sich der Ansicht Kämmerer's an: daß hier Diffusionsvorgänge eine Rolle spielen, indem das aus den Blutkörperchen freigewordene Hämoglobin oder Hämatin in die weitere Umgebung ausweicht und ein Abbau über das Hämatin hinaus nicht stattfindet.

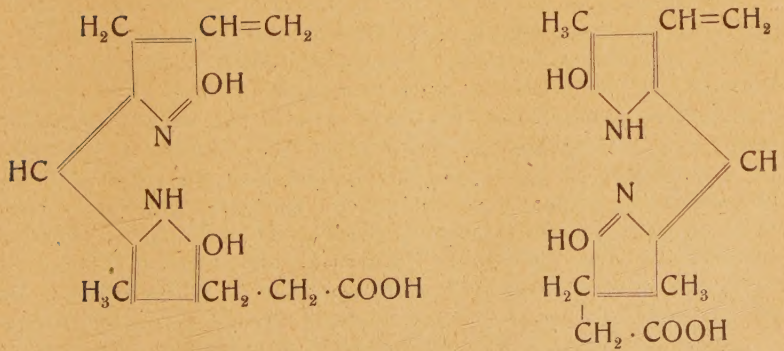
Mir wurde nun die Aufgabe gestellt, in Anlehnung an die zahlreichen früheren Arbeiten Bingold's den biologischen Blutfarbstoffabbau an Hand von Pneumokokkenkulturversuchen zu studieren und festzustellen, ob es sich um ähnliche Vorgänge handelt, wie sie Bingold beim Einfluß von H_2O_2 auf katalasefreien Blutfarbstoff fand.

Bingold hatte seinerzeit als Endstufe eines solchen Oxydationsprozesses auf Hämoglobin einen neuen Farbstoff entdeckt, den er Pentdyopent benannt hat. Hans Fischer, München, hat dann an Hand des ihm von Bingold übermittelten Substrates feststellen können, daß es sich bei dem Pentdyopent im Prinzip um eine Dioxy-Pyrrhomethin-Struktur handle. — Ueber die näheren Eigenschaften dieses Farbstoffs vermittelt uns Bingold folgendes:

„Da das natürliche Pentdyopent methylierbar und benzoylierbar ist, kann man nach H. Fischer aus Analogiegründen mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit 'mit dem Abbau von Blut und Gallenfarbstoff eine zweiseitige Herausoxydation zweier Methingruppen, z. B. der α- und γ-Methingruppe' annehmen (siehe Schema!).



Hämin.



Pentdyopent.

Die Bezeichnung Pentdyopent bezieht sich auf die Absorptionsbande bei 525 $\mu\mu$, die ein dem Blutfarbstoff entstammender Körper erkennen läßt. In der Klin. Wschr. 1934, Nr. 41, und 1935, Nr. 36 wurde bei der Beschreibung eines vorher unbekannten physiologischen Oxydationsmechanismus am Hämoglobin von mir dargelegt, daß eine Blutlösung nach vorheriger Katalaseentziehung völlig durch H_2O_2 entfärbt werden kann. Das dabei auftretende Substrat ergibt bei Kalilaugezusatz und Reduktion mit $Na_2S_2O_4$ eine typische Rotfärbung und zugleich tritt ein gut erkennbares Spektrum bei 525 $\mu\mu$ auf (= Pentdyopentreaktion)."

Die Eigenschaften des Pentdyopents sind folgende:

1. Es ist sehr gut in Wasser und verdünntem Alkohol löslich (besonders bei Zusatz von Alkalien, jedoch auch in schwachen Säuren), kaum dagegen in absolutem Alkohol, Chloroform und Aether.

2. Es ist weitgehend hitzebeständig und verliert auch bei längerem Kochen nicht seine Eigenschaften.

3. Es ist mit Ammonsulfat ausfällbar und mit Aceton, bei geringem NH_3-Zusatz, wieder herauszulösen. Bleiacetat fällt es nicht, im Gegensatz zu Bilirubin und Urobilin.

4. Es ist eiweiß-, eisen- und schwefelfrei.

5. Die Reduktion des Pentdyopent führt in alkalischer Lösung zu einem roten Farbenumschlag, der bei Luftzutritt (= Rückoxydation) wieder abblaßt, bei erneuter Reduktion wieder auftritt = Redoxeigenschaft.

6. Es hat ein typisches Spektrum und eine typische Farbkurve.

Ueber die biologische Bedeutung des Pentdyopent liegen nach den Bingold'schen Versuchen vorläufig folgende Erkenntnisse vor:

Pentdyopent ist ein natürlicher Bestandteil des Blutes; in pathologischen Fällen kommt es auch im Urin und manchmal sogar in gewissen Exsudaten vor. Ort der Pentdyopentbildung im menschlichen Körper ist die Niere, die es aus Bilirubin und Urobilin durch Oxydationsvorgänge bildet. So findet es sich bei Ikterus, bei Leberstauungen, dekompensierten Herzfehlern, bei fieberhaften Prozessen, kurz, bei all den Vorgängen, für die eine Bilirubin- und Urobilinausscheidung im Urin kennzeichnend ist. Bei der perniciösen Anämie kann dagegen das Pentdyopent eigenartigerweise im Urin nicht beobachtet werden. Auch in Fällen hochgradigster Anämie mit erheblicher Bilirubinämie und Urobilinurie wird seine Bildung vermißt, vielleicht auf Grund einer Hemmung des Oxydationsvermögens der Niere. Im allgemeinen geht jedoch der Abbau von Bilirubin zum Pentdyopent äußerst rasch vonstatten. Oft ist im Urin schon

Pentdyopent vorhanden, wenn Bilirubin im Serum noch nicht vermehrt nachweisbar ist. Daraus ist zu schließen, daß für die Niere bei einer Bilirubinämie schon ein ganz geringes Angebot von Gallenfarbstoff aus dem Blut genügt, um ihn restlos auf dem Wege der Oxydation zu Pentdyopent abzubauen. In ihr finden wir nämlich den Ort, an dem ein Teil des Blutes, der zum Untergang bestimmt ist, seiner Katalase verlustig geht. Der so seines Schutzkomplexes beraubte Blutfarbstoff geht ohne irgendwelche Zwischenstufen des Abbaues durch die oxydativen Vorgänge in der Niere in Pentdyopent über. Physiologischerweise wird ein Teil des gebildeten Pentdyopents wieder vom Blut rückresorbiert, sodaß ein ziemlich konstanter Pentdyopentblutspiegel gewährt wird. Ein Ueberschuß an Pentdyopent wird im Urin rasch ausgeschieden. Bingold konnte diese Erscheinung beobachten, als er Pentdyopent — das auch in großen Dosen ungiftig ist — ins Blut einspritzte; schon nach ganz kurzer Zeit wurde es im Urin wieder nachweisbar. Nur bei Erkrankungen, die mit Harnretention einhergingen, wurde es verspätet ausgeschieden.

Es läßt sich noch nicht übersehen, welche Aufgaben dem Pentdyopent als physiologischem Bestandteil des Blutes zukommen. Sicher kann aber gesagt werden, daß ihm bei den Regulationsvorgängen um die Konstanterhaltung der Blutwerte eine entscheidende Rolle zukommt.

Bevor wir auf das von uns gesteckte Endziel, dem Nachweis von Pentdyopent auch als Abbauprodukt der Pneumokokken, losteuern, müssen wir auf die einzelnen Faktoren, die Bingold als Grundbedingung des Zustandekommens dieses eigenartigen oxydativen Blutfarbstoffabbaues auffaßt, näher eingehen.

1. Bedeutung der Katalase.

Bingold hatte in einem seiner ersten Modellversuche festgestellt, daß bei Zusatz von chemisch reinem, 3%igem Wasserstoffsuperoxyd zu katalasefreiem Blut eine völlige Zerstörung von Hämoglobin erfolgt, bei der ein von früher her bekanntes Umsetzungsprodukt nicht mehr nachzuweisen ist. Er hat zugleich zum erstenmal die Bedeutung der Katalase als Antagonist des H_2O_2 klar erkannt und sie als den „Blutfarbstoffschutzkomplex" bezeichnet. Das war früheren Autoren bei ihrer Katalaseforschung völlig entgangen. Das Wasserstoffsuperoxyd kann auf Blut nur dann einwirken, wenn sein Schutzkörper, eben die Katalase, zerstört ist.

Diese Zerstörung des Blutfarbstoffschutzes (— der Katalase) kann erfolgen:

a) auf chemischem Wege, durch Säuren oder Laugen;

b) durch bakterielle Einflüsse, und zwar besitzen von den Bakterien diese Eigenschaft nach Bingold und Schultz nur bestimmte Staphylokokken; eine Veränderung der Platte im Sinne einer Entfärbung führen diese Keime dagegen nicht herbei;

c) durch thermische Einflüsse, Kochen des Blutes.

Bei seinen bakteriologischen Studien konnte nun Bingold schon 1927 zeigen, daß gewisse Bakterien den Blutfarbstoff völlig zersetzen können, wenn dem Hämoglobinagar seine Katalase entzogen war.

Als solche wurden von sämtlichen Bakterien Pneumokokken, Streptokokkus viridans und Streptokokkus mucosus erkannt. Nur sie können einen so auffälligen Farbenumschlag auf der Kochbluthämatinplatte hervorrufen. Nie fand sich die Umsetzung bei Colibazillen oder bei Staphylokokken.

2. Bedeutung des Hydroperoxyds.

Der indirekte Beweis, daß auch die Bakterien Wasserstoffsuperoxyd bilden, konnte dadurch erbracht werden, daß eben sämtliche Reaktionen, ob sie nun unter 3%igem Wasserstoffsuperoxyd oder ob sie unter der Bakterieneinwirkung verlaufen, parallel gehen. So zeigt ein Bingold'scher Modellversuch folgendes:

Setzt man eine gewöhnliche Menschenblutplatte der chemischen H_2O_2-Wirkung aus, indem man z. B. in die der oberen Agarschicht entgegengesetzte (unteren) Plattenschale H_2O_2-Lösung bringt, so ergibt sich auch hier ähnlich wie bei dem von uns auf Seite 1 geschilderten Versuch 1 keinerlei Veränderung, da eben das Blut vermöge seines hohen Katalasegehaltes gegen das Wasserstoffsuperoxyd geschützt ist. Sie zersetzt im Gegenteil H_2O_2 unter Abspaltung von molekularem Sauerstoff und hebt seine zerstörende Kraft auf.

Anders ist es bei Einwirkung von H_2O_2 auf eine Kochbluthämatinplatte, bei der durch Erhitzen auf 73° die Katalase zerstört wurde. Bringt man z. B. ein mit H_2O_2 getränktes Filtrierpapier auf die der Kochblutplatte gegenüberliegende untere Platte und verschließt sie gut, so zeigt sich hier die gleiche Entfärbung wie im biologischen Experiment. Auch hier ist als Beweis für einen weitgehenden Abbau die positive Eisenreaktion zu beobachten.

Die zerstörende Wirkung der hydroperoxydbildenden Bakterien einerseits und des chemischen H_2O_2 andrerseits, die beide die Platte so anschaulich entfärbten, wird jedoch sofort aufgehoben bzw. weitgehend beeinträchtigt, wenn man nur eine Spur frischen Menschenblutes hinzusetzt. Das Schutzferment dieses unpräparierten

Hämoglobins entfaltet sofort wieder seine Tätigkeit und verhindert den weiteren Abbau des Blutfarbstoffes.

Gänse-, Enten- oder Taubenblut (Versuch 5 und 6) werden auch durch chemisch reines 3%iges H_2O_2 ohne vorheriges Erhitzen bereits bei Körpertemperatur angegriffen und entfärbt. Der Katalasegehalt dieser Blutart muß also außerordentlich gering sein.

Aus all diesen Versuchen, sowohl den bakteriellen als auch den chemischen ist zu ersehen, daß für die Einwirkung der Bakterien oder des chemischen Wasserstoffsuperoxyds nicht die Umwandlung des Oxyhämoglobins in Methämoglobin oder Hämatin von Bedeutung ist, um einen Blutfarbstoffabbau herbeizuführen, sondern die Ausschaltung des Blutfarbstoffschutzkörpers. Erst dann, wenn seine Zerstörung erfolgt ist, kann das H_2O_2 oder das Bakterienwachstum entfärbend einwirken.

Die jeweilige Temperatur, die dazu nötig ist, hat Bingold die „Zerstörungstemperatur" genannt. Wird das Blut auf diesen Temperaturgrad gebracht, so vermag es dem einwirkenden Wasserstoffsuperoxyd nur noch wenig spaltende Kraft entgegensetzen und der Blutfarbstoffabbau kann sich vollziehen. Diese Zerstörungstemperatur ist für die einzelnen Tierblutarten, infolge ihres wechselnden Katalasegehaltes, sehr verschieden.

Sie wird festgestellt, indem man die Blutlösung ganz langsam und unter stetem Umrühren vorsichtig erwärmt. In Abständen von je einem Temperaturgrad zum andern entnimmt man Proben und versetzt sie mit Wasserstoffsuperoxyd. Anfänglich kommt es dabei noch zu stürmischem Aufschäumen, bis dann plötzlich bei weiterem Erwärmen ein deutlicher Farbenumschlag ins Gelbliche als Zeichen der Entfärbung der Blutlösung und Wirkung des H_2O_2 eintritt. Der abgelesene Temperaturgrad zeigt die Zerstörungstemperatur an.

Von Bingold wird folgende Tabelle für die Zerstörungstemperatur der einzelnen Tierblutarten auf Grund wiederholter Versuche angegeben:

Mensch	73 °—74 °	Hirsch	64 °
Rind	70 °	Löwe	61 °
Pferd	69 °	Katze	60 °
Ziege	68 °	Amsel	60 °
Rehbock	68 °	Ratte	59 °
Truthahn	68 °	Kaninchen	58 °
Hammel	67 °	Hund	50 °
Huhn	65 °	Ente	bei Körperwärme, also nicht erhitzt.
Esel	65 °	Gans	
Schwein	64 °	Taube	

Während also Menschenblut in so reichem Maße durch Katalase geschützt ist, wird Enten-, Tauben- und Gänseblut schon bei Körpertemperatur angegriffen. Deshalb auch bei unseren Versuchen Einsetzen des Abbaues schon am Oxyhämoglobin! Alle anderen Tierblutarten müssen erst auf die eruierte Zerstörungstemperatur gebracht werden, damit sowohl Wasserstoffsuperoxyd als auch H_2O_2-bildende Bakterien Entfärbung und Eisenabspaltung bewerkstelligen können. Es zeigt sich dabei, daß die Eisenreaktion durchschnittlich 2° unter der Zerstörungstemperatur positiv wird, d. h. daß der endgültige Abbau schon vor völliger Zerstörung der Katalase einsetzt.

Erfüllten die bakteriologischen Versuche dieselben Voraussetzungen für den oxydativen Abbau des Hämoglobins, die für den Blutfarbstoffabbau durch H_2O_2 bei mangelnder Katalase maßgebend waren, so mußte nunmehr festgestellt werden, ob die Endstufe des bakteriologischen Blutfarbstoffabbaues durch Pneumokokken ebenfalls beim Pentdyopent gesetzt war.

Nach den Vorschlägen von Bingold arbeitete ich folgende Methode aus:

Die bei unseren Versuchen mit der Kochbluthämatinplatte erhaltenen Aufhellungsbezirke von je 5 Platten werden ausgestochen, mit Sand verrieben und nach Zusatz von Alkohol zentrifugiert. Nach zweimaligem Filtrieren wird das Filtrat eingedampft. Danach wird mit 5 ccm Wasser und 5 ccm Alkohol gelöst, nochmals filtriert, 1 bis 2 ccm Kalilauge hinzugegeben und gekocht, wobei die Lösung vollkommen durchsichtig wird. Zwecks Reduktion wird Natriumhyposulfit (Merck) zugesetzt und nochmals kurz aufgekocht.

Einleitend wurde schon darauf hingewiesen, daß das Pentdyopent ein typisches Spektrum bei 525 $\mu\,\mu$ besitzt.

Die reduzierte Lösung wurde deshalb in verschieden dicker Schicht im Schumm-Löwe'schen Gitterspektroskop betrachtet.

Im einzelnen wurden unsere Züchtungen folgendermaßen vorgenommen:

1. Pneumokokken ausgestrichen auf unerhitztem Menschenblut und 24 Stunden bebrütet: Pentdyopent auch bei Ausbeute von 30 Platten negativ.
2. Pneumokokken auf Blut, das auf 70° erhitzt wurde: Pentdyopent bei Verarbeitung von 5 Platten bereits angedeutet. Hier zeigte sich noch keine Aufhellung. Hämatin überwiegt die Pentdyopentbildung.
3. Pneumokokken auf Blut, das auf 75° erhitzt wurde: Resultat schon bei 2 Platten ++.
4. Pneumokokken auf Kochblut: Resultat schon bei 3 Platten ++.

5. Pneumokokken auf Kochblut + künstlicher Katalase: bei Verarbeitung von 10 Platten negativ.
6. Pneumokokken auf Gänseblut
7. Pneumokokken auf Taubenblut
8. Pneumokokken auf Entenblut
} unerwärmt: bei Verarbeitung von 5 Platten stets +.
9. Pneumokokken auf Rinderblut
10. Pneumokokken auf Pferdeblut
} unerwärmt: negativ.

Als Resultat ergab sich übereinstimmend: In allen Fällen, in denen bei unseren Versuchen das Blut seiner Katalase beraubt war, konnte Pentdyopent als Zeichen eines weitgehenden Blutfarbstoffabbaues durch die Pneumokokken nachgewiesen werden.

Es ergab sich stets bei unseren Nachprüfungen das typische Absorptionsband bei 525 $\mu\,\mu$. Bei Versuch 1, 2, 5, 9 und 10 konnte der oxydative Abbau am Hämoglobin noch nicht weitgehend einsetzen, da das Blut durch seinen Katalasegehalt stark geschützt war. Immerhin war bei Erwärmen bis 70° bereits ein geringer Abbau bis Pentdyopent möglich. Makroskopisch wäre das aber noch nicht an der Farbveränderung der Platte erkennbar gewesen. Wurde es dagegen vorher auf seine Zerstörungstemperatur gebracht, d. i. für Mensch 73°, für Rind 70°, so zeigte auch das Spektrum das Vorhandensein von Pentdyopent (Versuch 3, 4, 9). Bei Gänse-, Enten- und Taubenblut setzte der Abbau schon am unbehandelten Blut ein, da es, wie schon eingangs erwähnt, wenig oder gar keine Katalase enthält; auch hier konnten wir Pentdyopent im Spektrum nachweisen.

Zusammenfassend konnte also festgestellt werden:

1. Daß gewisse Bakterien, insbesondere die Pneumokokken, Streptokokkus viridans, aber auch bei längerer Züchtung die hämolytischen Streptokokken, die Fähigkeit besitzen, Wasserstoffsuperoxyd zu bilden. Damit ist zugleich der Beweis für die Dehydrationstheorie von Wieland erbracht worden, die für die lebende Zelle das Auftreten von H_2O_2 bei der Zellatmung postulierte. Es war von Wieland aber seinerzeit darauf aufmerksam gemacht worden, daß H_2O_2 im Stoffwechsel der lebenden Zelle bislang nicht nachweisbar war.

2. Als Indikator für H_2O_2 dient hier der Pentdyopentnachweis: Pentdyopent kann aus Hämoglobin nur gebildet werden, wenn H_2O_2 auf Blutfarbstoff einwirkt. Unter der Einwirkung von H_2O_2 kommt es zu einem weitgehenden Abbau des Blutfarbstoffes nur dann, wenn das Blut seiner Katalase beraubt ist. Sollen also die verschiedenen Blutarten von den Pneumokokken bis zu Pentdyopent

abgebaut werden können, so müssen sie vorher auf die jeweilige Zerstörungstemperatur gebracht werden. Beim Auftreten von Pentdyopent handelt es sich also darum, wer von den beiden Gegenspielern — ob H_2O_2 oder sein Antagonist, die Katalase — den Sieg davonträgt. Wie Bingold feststellen konnte, handelt es sich dann, wenn H_2O_2 auf schutzlos gewordenes Hämoglobin einwirken kann, um einen Zerstörungsprozeß, wie ihm ein gleichartiger mit chemischen Reduktions- oder Oxydationsmitteln kaum zur Seite zu stellen ist. Hier zeigt sich, daß die lebende Zelle mit Hilfe katalytischer Kräfte ungeheure Einwirkungen auf den Blutfarbstoff auszuüben vermag.

3. Es ist zu betonen, daß in jedem Fall von Kulturversuch mit Pneumokokken auf katalasefreiem Blut Pentdyopent nachzuweisen war. Ein gewisses Mißverhältnis bestand nur hinsichtlich der gebildeten Menge. Es könnte möglich sein, daß auch noch andere Körper gebildet werden, die durch die spektroskopische Untersuchung nicht zu erfassen sind. Auf jeden Fall handelt es sich durchwegs um eisenfreie Substanzen, denn die Berlinerblaureaktion war durchgehend positiv.

Am Schlusse meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. Bingold für die Ueberlassung des Themas und für die freundliche Anleitung und Herrn Prof. Dr. von Angerer für die Uebernahme des Referates herzlichst zu danken.

Literatur:

Bingold: Blutfarbstoffvernichtende Bakterien (Zentralblatt für Bakteriol., Parasitenkunde und Infektionskrankheiten 1930, Bd. 119).
— —: Blutstoffwechsel (Handbuch der allgemeinen Hämatologie, 1932).
— —: Modellversuch zur sichtbaren Darstellung eines biologischen Blutfarbstoffabbaus.
— —: Klinische Wschr. 1934, 1451, und 1935, 1287.
— —: Dtsch. Arch. klin. Med. 177, 230, 1936.
— —: Z. experim. Med. 99, 325, 1936.
Hans Fischer u. Müller: Ueber die Pentdyopentreaktion. Hoppe-Seylers Z. 246, 1937.
Fichtl K.: Untersuchungen über das Pentdyopent. (Inauguraldissertation Hamburg 1935.)
Heim: Lehrbuch der Bakteriologie, 1911.
Hulst u. Grotepaß: Ueber das Pentdyopent von Bingold. Klin. Wschr. 1936, Nr. 6.
Kraus W.: Zur Frage des Blutfarbstoffabbaus unter bakterieller Einwirkung. (Inauguraldissertation Erlangen 1934.)
Lehmann-Neumann: Bakt. Diagnostik, II. Bd. 1927.
Seitz: Zentralbl. f. Bakt. I, Orgbd. 88.
Wimplinger: Weitere Untersuchungen über das Vorkommen eines neuen Blutfarbstoffabbauprodukts (Pentdyopent) im Harn. Dtsch. Med. Wschr. 1935, 37.

Lebenslauf.

Ich wurde als Tochter des Volksschullehrers Robert Bergmann am 22. Dezember 1910 in Gotthofen bei Uffenheim geboren. Von 1917—21 besuchte ich die Volksschule in Altdorf bei Nürnberg, 1921—27 das St. Mädchengymnasium, 1927—30 die Oberrealschule in Nürnberg. Hier legte ich 1930 die Reifeprüfung ab. Darnach widmete ich mich dem Studium der Medizin, studierte fünf Semester in Erlangen, wo ich im Juli 1932 das Physikum bestand. 1933—35 studierte ich in Innsbruck und Rostock, die letzten vier Semester verbrachte ich in München. Dort legte ich im Wintersemester 1935/36 das medizinische Staatsexamen ab. Am 1. Februar 1936 begann ich das Medizinalpraktikantenjahr am Städt. Krankenhaus in Nürnberg, am 1. Februar 1937 erhielt ich meine Bestallung als Arzt. Vom 1. April 1937 bis 1. September 1938 war ich Assistenzärztin am Privatsanatorium Dr. Kahlbaum in Görlitz. Seit 15. September 1938 bin ich als Aerztin an einem Mutter- und Kinderheim des vom Reichsführer SS betreuten Vereins Lebensborn.

Resi Bergmann.